

09/830659

PCT/J199/05964

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

19.11.99⁴

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

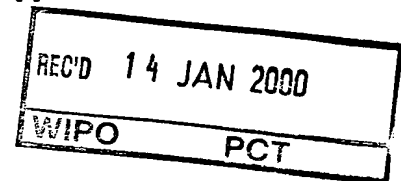
1998年10月30日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第310285号

出 願 人
Applicant(s):

寶酒造株式会社

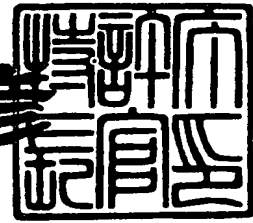


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3089605

【書類名】 特許願

【整理番号】 T-1340

【提出日】 平成10年10月30日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
G01N 33/50

【発明の名称】 内分泌かく乱物質によって影響を受ける遺伝子の検出方法

【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 近藤 昭宏

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 峰野 純一

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 君塚 房夫

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063223

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 内分泌かく乱物質によって影響を受ける遺伝子の検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を検出する方法であって、内分泌かく乱物質を含む試料と接触させた細胞、組織または生物体由来の mRNA またはその cDNA を含む核酸試料を調製し、該核酸試料を DNA 断片が固定された DNA アレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いたものと比較して内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を選択することを特徴とする遺伝子の検出方法。

【請求項 2】 請求項 1 記載の方法により検出された遺伝子の発現を測定することを特徴とする内分泌かく乱物質の検出方法。

【請求項 3】 内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を検出する方法であって、当該物質が含まれると予想される試料と接触させた細胞、組織または生物体由来の mRNA またはその cDNA を含む核酸試料を調製し、該核酸試料を内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子もしくはその断片が固定された DNA アレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いたものと比較して、内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を検出することを特徴とする検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体の恒常性に影響をおよぼす内分泌かく乱物質、及び該物質の影響を受ける遺伝子の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

内分泌かく乱物質は、しばしば環境ホルモンともよばれており、環境中に放出された化学物質のうちホルモン類似作用あるいは抗ホルモン作用が見出されたものを総称して言う。野生動物の生態系への影響としては、生殖能の変化、特に雄の雌化、生殖能の低下、ふ化率の低下、子の生存率の低下、生殖行動の異常等が

報告されている。また、ヒトの健康への影響としては、精子数の減少、子宮内膜症、不妊、卵巣ガン、子宮ガン、前立腺ガン等が疑われているが、証明はされていない。

【0003】

内分泌かく乱を引き起こすと考えられている物質として、アルキルフェノール、ビスフェノールA、ダイオキシン類、DDTおよびその代謝物、フタル酸エステル、トリブチルスズ、塩素化炭化水素類、有機金属、植物エストロゲン等が知られている。

【0004】

これらの物質の一次作用としては、1) ホルモンレセプターとの直接作用（合成ホルモン製剤、DDT、フタル酸エステル等）、2) 他のレセプターを介する作用（ダイオキシン等）、3) 代謝阻害作用（ステロイド代謝阻害剤、アロマターゼや5 α -レダクターゼの阻害剤等）、4) 他のシステムを介する作用（神経系や免疫系に影響を与える物質）などが知られており、作用様式は多様である〔化学、第53巻、第7号、第12～15頁（1998）〕。

【0005】

一方、内分泌かく乱物質の測定法としては、インビトロとインビボの2通りの方法が知られており、前者では、エストロジェンレセプターやアンドロジェンレセプターとの結合活性を測定する方法や、ホルモン合成酵素系の阻害活性を測定する方法が知られている。後者では、出生後日齢の異なるラットの各種ホルモン産生および組織形成異常を測定する方法、カエルの変態異常を測定する方法、サカナの成熟異常を測定する方法等が知られている〔アナリティカル ケミストリー (Analytical Chemistry) 第70巻、第15号、第528A～532A頁（1998）〕。

【0006】

しかし現在のところ、注目されている内分泌かく乱物質と疑われている物質が本当に内分泌かく乱を引き起こすのか、もし引き起こすならどのようなメカニズムで影響を及ぼしているのか、さらに、どのくらいの量をどれくらいの時間摂取すると危険なのかについての明解な解答は得られていない。

【0007】

例えば、現在行われているホルモンレセプターとの結合試験は、一次スクリーニングという見地からすれば、必要かつ重要な方法である。しかし、この方法で得られる結果は、内分泌かく乱物質であることを保証するものではない。すなわち、エストラジオール（女性ホルモン）もDES（内分泌かく乱物質）もイソフラボン（豆に含まれるヒトには無害な成分）もビスフェノールA（内分泌かく乱物質と疑われている物質）も EC_{50} の値に差はあるものの、全てエストロゲンレセプターに結合するため、このアッセイ方法ではどの内分泌かく乱作用を持っているか区別できない。これは、従来の酵母を用いたアッセイ系、培養細胞を用いる系、ネズミの子宮重量を測定する系などのいずれの方法でも同じである。

【0008】

すなわち現在のホルモンレセプターへの結合活性やホルモン合成酵素系の阻害活性を、インビトロで測定する方法は、内分泌かく乱物質測定法としての必要条件是満たしているが、決して十分条件ではない。また、ラット、カエル、サカナ等の生育や形態形成に及ぼす影響をインビボで調べる方法は、感度が低い上複雑で、多数のサンプルを調べるには長時間を必要とする。

【0009】

上記のように環境ホルモンの問題においては、内分泌かく乱物質を確定し、また該物質が内分泌系に与える影響を調べる必要性がある。つまり、内分泌かく乱物質において、どのようなシグナル伝達経路に影響を与えているのか、また内分泌かく乱を引き起こすのはどういう物質なのかを解析する方法が求められている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、（１）内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子、（２）該方法により検出された遺伝子の発現、及び（３）内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の検出方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、迅速、高感度でしかも同時に内分泌かく乱物質によって影響を受ける多種類の遺伝子を検出する方法を構築した。また、該遺伝子もしくはその断片を固定化したDNAアレイを用いて、内分泌かく乱物質を検出する方法を見出した。さらに、内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の検出方法を構築し、本発明を完成するに至った。

【0012】

即ち、本発明の要旨は、

〔1〕 内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を検出する方法であって、内分泌かく乱物質を含む試料と接触させた細胞、組織または生物体由来のmRNAまたはそのcDNAを含む核酸試料を調製し、該核酸試料を任意のDNA断片が固定されたDNAアレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いたものと比較して内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を選択することを特徴とする遺伝子の検出方法、

〔2〕 請求項1記載の方法により検出された遺伝子の発現を測定することを特徴とする内分泌かく乱物質の検出方法、ならびに

〔3〕 内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を検出する方法であって、内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を含むと予想される試料と接触させた細胞、組織または生物体由来のmRNAまたはそのcDNAを含む核酸試料を調製し、該核酸試料を内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子もしくはその断片が固定されたDNAアレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いたものと比較して、内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を検出することを特徴とする検出方法に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

（1）本発明の内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子の検出方法

本明細書において内分泌かく乱物質とは、外因性内分泌かく乱物質もしくは環境ホルモンとも称されるが、動物の生体内に取込まれた場合に、本来、その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質を意味し、正常なホルモン作用を維持するもの、促進するもの及び抑制するものも含まれる。

また、正常なホルモン作用に影響を与える可能性のある物質も含まれる。該物質については特に限定されるものではないが、たとえば、ヒトの腫瘍を引き起こすことが知られているジエチルスチルベストロール（DES）や骨そしょう症治療に有効でありかつ乳癌のリスクを低減させることが知られている植物エストロゲンのイソフラボン等が挙げられる。

【0014】

本明細書記載の内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子とは、上記の内分泌かく乱物質によってその発現が対照と比較して促進もしくは抑制される遺伝子を意味する。該遺伝子は、1種類でも複数の種類であってもよい。さらに、内分泌かく乱物質が直接的に影響を与えるもの及び間接的にその発現に影響を与える遺伝子も含まれる。該遺伝子としては特に限定されるものではないが、たとえば、上記ジエチルスチルベストロールやイソフラボンが結合することが知られているエストロゲンレセプター遺伝子及びそのシグナル伝達経路に関与する遺伝子等が挙げられる。

【0015】

上記内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子は、以下の方法により検出することができる。

本明細書において検出するとは、検出するのみならず測定する、選択する、確認する、判定するの意味をも含むものとする。

【0016】

また、本明細書において使用されるDNAアレイとは、支持体上に遺伝子またはその断片が固定されているものを示し、例えばDNAチップと呼称されているものを包含する。支持体は、ハイブリダイゼーションに使用可能なものであれば特に限定はなく、通常スライドガラス、シリコンチップ、ニトロセルロースやナイロンの膜等が使用される。また、支持体上に固定される遺伝子またはその断片としては、特に限定するものではないが、例えばゲノムDNAライブラリーあるいはcDNAライブラリーを鋳型としたPCR等によって増幅されたDNAを使用する事ができる。上記の遺伝子またはその断片を公知の方法、例えばアミノ基を導入した支持体上に固定することにより該DNAアレイを作製することがで

きる。

また、上記固定化の操作をDNAアレイ作製装置、例えばGMS社製のDNAチップ作製装置を使用して行なうことにより、遺伝子が高密度に整列、固定化されたDNAアレイを作製することもできる。

【0017】

このようなDNAアレイを使用することにより、核酸試料中に含まれる多種類の核酸分子の量を同時に測定することができる。また、少量の核酸試料でも測定できるという利点がある。

【0018】

本発明で使用されるDNAアレイには、ホルモンの作用発現に関連した機能を有するタンパクをコードする遺伝子またはその断片が固定される。このような遺伝子としては、特に限定されるものではないが、例えばホルモンレセプター遺伝子、レセプターのコファクターをコードする遺伝子、レセプターからのシグナル伝達に関与するタンパクをコードする遺伝子、ホルモンの生合成もしくは代謝に関与するタンパクをコードする遺伝子、またはオンコジーン等が挙げられる。

【0019】

また、内分泌かく乱物質の影響によってその発現が変化している遺伝子を含む核酸試料としては、例えば内分泌かく乱物質に感受性を示す細胞や組織（臓器）に任意の内分泌かく乱物質を接触させた後、経時的あるいは経日的に細胞や組織より調製されるmRNA、もしくは該mRNAを鋳型とした逆転写反応により得られるcDNAを使用することができる。

【0020】

内分泌かく乱物質を含んだ試料と接触させる細胞は、生物体から採取したものでも培養細胞でも良い。また、組織は、内分泌かく乱物質によって影響が出ていると思われる部位であれば特に限定はない。さらに使用する細胞、組織もしくは生物体は、特にヒトに限定されるわけではない。

【0021】

一方、対照とする細胞、組織または生物体よりmRNAもしくはそのcDNAを含む核酸試料についても上記と同様に調製し、ハイブリダイゼーションさせる

。核酸試料がDNAアレイ上のDNAとハイブリダイゼーションしているか否かの結果を容易に確認できるように下記のように適当な標識をしておくことができる。

【0022】

標識方法としては特に限定されるものではないが、例えば放射性同位元素、蛍光物質、化学発光物質、適当な抗体により認識される抗原等の物質を使用することができる。また、核酸試料を認識することなくハイブリダイゼーションを行い、その後に蛍光、化学発光を発するインターカレーター物質を使用してもよい。

【0023】

こうして得られた核酸試料と上記DNAアレイ上のDNAとのハイブリダイゼーションは、公知の方法で実施することができる。ハイブリダイゼーション及び洗浄工程は、DNAアレイ上のDNAの鎖長等に応じて最適な条件で行なうことは当然であるが、例えばモレキュラー クローニング、ア ラボラトリーマニュアル (Molecular cloning, A laboratory manual)、第2版、第9. 52～9. 55頁 (1989) に記載の条件で行なうことができる。

【0024】

内分泌かく乱物質を含んだ試料と接触させた細胞、組織または生物体由来の核酸試料と対照の核酸試料とのハイブリダイゼーションの結果を比較することにより、両方でシグナルの強度に有意な差のある遺伝子を検出することができる。具体的には、上記の方法で標識された遺伝子がハイブリダイズしたアレイについて放射能、蛍光、発光等のシグナル強度を専用測定器、例えばクロマトスキャナーもしくはイメージアナライザー等を用いて検出することによって、そのシグナル強度の差から当該内分泌かく乱物質の影響により、その発現量が有意に変化する遺伝子を検出することができる。

【0025】

また、複数の標識、例えば2種類の蛍光を検出することができる多波長検出蛍光アナライザーを用いれば、内分泌かく乱物質と接触させた細胞、組織または生物体由来の核酸試料と対照の核酸試料との遺伝子発現の差を同じDNAアレイ上で比較することができる。例えば、内分泌かく乱物質と接触させた細胞由来の核

酸試料はCy 3-dUTPで蛍光標識し、対照の核酸試料はCy 5-dUTPで蛍光標識する。両者を等量混合してDNAアレイとハイブリダイゼーションを行なうことで両者の遺伝子発現の差を色の違いとして検出することができ、その結果から当該内分泌かく乱物質の影響によりその発現量が有意に変化する遺伝子を検出することができる。

さらに当該遺伝子は、内分泌かく乱物質を検出するための指標としても有用である。

【0026】

以上のように本発明の方法によって内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子、例えば細胞の核内レセプター及びそのシグナル伝達経路の下流で関与している多種類の遺伝子を同時にインビトロで迅速、高感度に検出することができる。また、従来知られていない新しいシグナル伝達経路に関与する遺伝子を検出することもできる。

【0027】

(2) 内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子の発現を指標とした内分泌かく乱物質の検出は、以下の方法により実施することができる。

上記内分泌かく乱物質の影響を受けていることが確認できた遺伝子について、上記のような方法で固定化したDNAアレイを作製する。

【0028】

次に内分泌かく乱物質によって影響を受けていると考えられる細胞、組織または生物体より上記のように核酸試料を調製し、上記と同様にハイブリダイズさせて、シグナル強度の差から遺伝子発現の変化を測定することができる。その結果から内分泌かく乱物質の存在を確認することができる。

【0029】

また、別の態様としては、内分泌かく乱物質の影響を受けていることが確認できた遺伝子のmRNAの競合RNAもしくはDNAを作製し、それを内部標準とした競合RT-PCR法により影響を受けている遺伝子の発現の度合いを定量的に測定することからも内分泌かく乱物質の存在を確認することができる。

【0030】

以上のように本発明の方法によって内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子、例えば細胞の核内レセプター及びその下流の多種類の遺伝子の発現を指標にして、内分泌かく乱物質の有無の実質的な判定を容易にすることができる。

【0031】

(3) 内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の検出は、以下の方法により実施することができる。

本明細書において内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質とは、本来、その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える可能性のある物質を意味し、その作用が確認されたものおよびいまだ確認されていないものも含まれる。

【0032】

内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の検出のためのDNAアレイは、上記(1)記載の方法で内分泌かく乱物質の影響を受けていることが確認できた遺伝子を上記と同様の方法で固定化して作製する。

【0033】

次に内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質を含むと予想される試料と接触させた細胞、組織または生物体より上記のように核酸試料を調製し、上記と同様にハイブリダイズさせて、遺伝子発現の変化をシグナル強度差として測定することができる。その結果から該物質は、内分泌かく乱物質と考えることができる。

【0034】

また、該DNAアレイ上の全DNAにおいてシグナルの変化が確認される場合のみならずその一部のDNAにおいてシグナルの変化が確認される場合においても同様にその結果から該物質は、内分泌かく乱物質と考えることができる。特にその一部のDNAにおいてシグナルの変化が確認される場合においては、(1)記載の方法で該物質の影響を受ける遺伝子をさらに別に選択することにより検出方法を最適化し、よりの確に該物質の内分泌かく乱を引き起こす物質を検出することができる。

【0035】

また、別の態様としては、上記のように内分泌かく乱物質の影響を受けていることが確認できた遺伝子の mRNA の競合 RNA もしくは DNA を作製し、それを内部標準とした競合 RT-PCR 法により内分泌かく乱を引き起こす度合いを遺伝子の発現より定量的に検出することもできる。

【0036】

以上のように本発明の方法によって、例えば細胞の核内レセプター及びそのシグナル伝達経路の下流で関与している遺伝子をインビトロで迅速、高感度で測定できるため、内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の有無を実質的に容易に判定することができる。

【0037】

【実施例】

以下に実施例をもってさらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

【0038】

実施例 1 DNA アレイの作製

内分泌かく乱物質の影響を受ける可能性のある遺伝子を表 1、表 2 に示した。

【0039】

【表 1】

因子名 (遺伝子産物)	GenBank 登録番号
1. 核内レセプター転写共役因子	
p300/CBP	U47741
SRC-1	U40396
N-CoR/SMRT	AF044209/U37146
ACTR	AF036892
RIP140	X84373
TRIP1	L38810
TIF2	X97674
Smad3	AB004924
efp	D21205
lactoferrin	X53961
progesteron receptor	M15716
cathepsin G	J04990
pS2 protein	X52003
prolactin	E02152
ARA70	L49399
vitamin D receptor	J03258
2. キナーゼ型伝達因子	
p38	L35253
p38 gamma	U66243
JNK1	L26318
JNK2	U09759
JNK3	AA992006
ERK1	M76585
BMK α,β,γ	U29725-U29727

【0040】

【表 2】

因子名 (遺伝子産物)	GenBank 登録番号
3. 性腺分化因子	
DAX1	U31929
SOX9	Z46629
WT1	X51630
SRY	L10101
Ad4BP/SF-1	D84206-D84209
EMX2	X68880
4. オンコジーン	
c-Fos	K00650/M16287
c-Myc	J00120/K01908
Bcl-2	M13994-M13995
Bax α, β, γ	L22473-L22475
Bax δ	U19599
Bcl-x	U72398
5. レセプター型キナーゼ	
NGF receptor	M14764
FGF receptor	M34641
FGF receptor	M34641
VEGF receptor	AF016050
PDGF receptor	M21616
CSF1 receptor	M33208-M33210
EGF receptor	M29366
insulin receptor	M10051

【0041】

これらの遺伝子の cDNA の 3' 側非翻訳領域を含む約 1 kb の断片を、以下のようにして調製した。

すなわち、ヒトおよびマウス由来の細胞および組織mRNA（クローンテック社製）を鋳型に、それぞれRT-PCR（逆転写-PCR）法により目的のcDNA断片を増幅した。増幅したcDNAの塩基配列分析を行って、目的の断片であることを確認するとともに、エタノール沈殿法により増幅断片を回収し、100 mM 炭酸バッファー（pH 9.5）で1 μ Mとなるように溶解した。この他、ハウスキーピング遺伝子として β -アクチン遺伝子を、また、ネガティブコントロールとしてプラスミドpUC18をそれぞれ同様に調製した。これらをDNAチップ作製装置（GMS社製）を用いてアミノ基導入スライドガラス（シグマ社製）にスポットし、UV照射により固定した。スライドを0.2% SDS、次いで蒸留水で洗浄乾燥してDNAアレイとした。

【0042】

実施例2 内分泌かく乱物質を摂取した動物臓器からのmRNAの抽出および標識cDNAの調製

10匹の2日齢の雌マウスを、内分泌かく乱物質投与群と非投与群に分け、投与群には内分泌かく乱を引き起こす可能性のあるジエチルスチルベストロール（DES）を0.1 mg/マウス/dayの割合で、2日間静脈注射した。4日目に卵巣を摘出し、mRNA抽出キット（キアゲン社製）を用いてmRNAを調製した。

【0043】

約3 μ gのmRNA、オリゴdTプライマー、投与群にはCy3-dUTP（アマシャム社製）または非投与群にはCy5-dUTP（アマシャム社製）を含むdNTP、および逆転写酵素（ギブコーBRL社製）を用いてcDNA合成反応を行い、ゲルろ過、次いで減圧濃縮し、4 \times SSC/0.2% SDSに溶解して蛍光標識cDNAを調製した。

【0044】

実施例3 内分泌かく乱物質と接触させた細胞からのmRNAの抽出および標識cDNAの調製

5% ウシ胎児血清（FBS）を含むDME培地で生育させたヒト乳がん細胞MCF-7をトリプシン処理した後、12ウエルの培養プレートに、ウエル当り

2×10^5 の細胞を入れ、同上培地で24時間保持した。培地を除去した後、活性炭-デキストラン処理でステロイドホルモン類を除去したヒト血清を5%含むDME培地で、10 pMの17- β エストラジオールの存在下または非存在下に72時間培養した。細胞を回収し、実施例2と同様にmRNAを抽出した。

【0045】

約3 μ gのmRNA、オリゴdTプライマー、17- β エストラジオール接触細胞の場合はCy3-dUTP、または17- β エストラジオール非接触細胞の場合はCy5-dUTPを含むdNTP、および逆転写酵素（ギブコーBRL社製）を用いてcDNA合成反応を行い、ゲルろ過、次いで減圧濃縮し、 $4 \times \text{SSC} / 0.2\% \text{SDS}$ に溶解して蛍光標識cDNAを調製した。

【0046】

実施例4 標識cDNAとDNAアレイとのハイブリダイゼーション

実施例2で調製したCy3-標識cDNAとCy5-標識cDNAを等量混合し、熱変性した後その5 μ lをDNAアレイに滴下し、カバーガラスをかけて周囲をフィルムで密閉した。これを40～45℃で10時間保持した後、カバーガラスを除いて、 $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ 中で30分、次いで $0.2 \times \text{SSC}$ 中で30分洗浄し、風乾した。これをマイクロアレイスキャナー（GMS社製）にかけて各スポットの蛍光シグナルを解析した。実施例3で得た標識cDNAについても同様の操作を行った。

【0047】

その結果、DESを投与したマウスの卵巣および17- β エストラジオールを接触させたMCF-7細胞において、有意なシグナルの変動が見られ、内分泌かく乱物質の影響をうける遺伝子を検出することができた。

【0048】

【発明の効果】

以上のように本発明の方法によって内分泌かく乱物質の影響を受ける多種類の遺伝子を同時にインビトロで迅速、高感度に検出できるという優れた効果を奏する。また、従来知られていない新しいシグナル伝達経路に関与する遺伝子の検出方法としても有用である。さらに本発明の方法によって得られた内分泌かく乱物

質の影響を受ける多種類の遺伝子の発現を指標にして、内分泌かく乱物質もしくは内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の有無を判定することができるという優れた効果を奏する。

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】

内分泌かく乱物質を含む試料と接触させた細胞、組織または生物体由来の mRNA またはその cDNA を含む核酸試料を調製し、該核酸試料を DNA 断片が固定された DNA アレイとハイブリダイズさせ、その結果を対照試料由来の核酸試料を用いたものと比較して内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子を選択することを特徴とする、内分泌かく乱物質の影響を受ける遺伝子の検出方法、ならびに上記遺伝子の発現を測定することを特徴とする内分泌かく乱物質および内分泌かく乱を引き起こす可能性のある物質の検出方法。

【効果】

本発明により、内分泌かく乱物質の存在の実質的な検出を容易に行うことが可能となる。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成10年12月 7日
【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成10年特許願第310285号

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

【発送番号】 028688

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 特許出願人

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

認定・付加情報

特許出願の番号	平成10年 特許願 第310285号
受付番号	59800786668
書類名	手続補正書
担当官	市川 勉 7644
作成日	平成11年 3月 2日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】	申請人
【識別番号】	591038141
【住所又は居所】	京都府京都市伏見区竹中町609番地
【氏名又は名称】	寶酒造株式会社

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地
氏 名 寶酒造株式会社